

Pengujian Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi terhadap Aktivitas Antioksidan Kulit Buah Delima (*Punica granatum L.*) serta Penetapan Kadar Flavonoid Total

Different Extraction Methods Effect on Antioxidant Activity of Red Pomegrate Peel (*Punica granatum L.*) and Determination of Total Flavonoid Content

¹Silvia Wulandari, ²Kiki Mulkiya, ³Livia Syafnir

^{1,2,3}Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Jl. Tamansari No.1 Bandung 40116

email: ¹viasilvia879@gmail.com, ²qqmulkiya@gmail.com, ³livia.syafnir@gmail.com

Abstract. This study aimed to evaluate the effect of different antioxidant activity of red pomegrate peel (*Punica granatum L.*) ferent extraction methods on and determination of total flavonoid levels. In this study the extraction was done by the method of maceration extraction and reflux extraction using 9: 1 solvent ratio, the solvent used was 95% of ethanol: HCl. Monitoring of extract components using Thin Layer Chromatography with silica GF245 stationary phase and mobile phase of ethyl acetate: chlorophone (8: 2). Antioxidant activity testing was performed by DPPH free radical scavenging method (1,1-diphenyl-2, picrylhydrazyl). The result showed that the was used in monitoring of extract components the extracts of maceration extraction had better antioxidant activity with IC₅₀ value 2,39 ppm whereas IC₅₀ value for extract at reflux extraction was 10.41 ppm. Determination of total flavonoid content was performed by using UV-Visible Spectrophotometry method. The result of determination of total flavonoid content on maceration extract is lower 1.025% compared to reflux extract 1,223%. From the results of the determination, it is seen that the total flavonoid content is not proportional to the extract of antioxidant activity. So that antioxidant activity suspected in red pomegranate peel is not influenced by total flavonoid content .

Keywords: Red pomegranate peel (*Punica granatum L.*), antioxidant activity, determination of total flavonoid rate.

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan kulit buah delima merah (*Punica granatum L.*) terhadap pengaruh perbedaan metode ekstraksi serta dilakukan penetapan kadar flavonoid total. Dalam penelitian ini ekstraksi dilakukan dengan metode ekstraksi maserasi dan ekstraksi refluks yang menggunakan perbandingan pelarut 9:1, pelarut yang digunakan adalah etanol 95% : HCl. Pemantauan komponen ekstrak menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dengan fase diam silika GF₂₄₅ dan fase gerak etil asetat : klorofom (8:2). Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2,pikrilhidrazil). Hasil pengujian aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa ekstrak pada ekstraksi maserasi memiliki aktivitas antioksidan lebih baik dengan nilai IC₅₀ 2,39 ppm sedangkan nilai IC₅₀ untuk ekstrak pada ekstraksi refluks adalah 10,41 ppm. Penetapan kadar flavonoid total dilakukan menggunakan metode spektrofotometer UV-Sinar Tampak. Hasil penetapan kadar flavonoid total pada ekstraksi maserasi lebih rendah yaitu 1,025 % dibandingkan pada ekstraksi refluks 1,223 %. Dari hasil penetapan tersebut, terlihat bahwa kadar flavonoid total tidak berbanding lurus dengan aktivitas antioksidan ekstrak. Sehingga diduga aktivitas antioksidan pada kulit buah delima tidak dipengaruhi oleh kadar flavonoidnya.

Kata Kunci: kulit buah delima merah (*Punica granatum L.*), aktivitas antioksidan, penetapan kadar flavonoid total.

A. Pendahuluan

Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghilangkan, membersihkan menahan pembentukan oksigen reaktif dan radikal bebas dalam tubuh. Radikal bebas di dalam sel tubuh dapat terbentuk akibat dari polusi atau terpaparnya radiasi kuat. Sumber radiasi kuat penyebab radikal bebas seperti sinar ultraviolet, sinar gamma radioaktif, radiasi seperti ini dapat memecahkan ikatan antara atom sehingga terjadi berbagai radikal dengan elektron tunggal yang siap menimbulkan reaksi kerusakan yang berantai. Apabila hal tersebut terjadinya secara terus menerus dapat menyebabkan kerusakan dan kematian sel (Youngson, 2005).

Kulit buah delima (*Punica granatum* L) merupakan salah satu sumber antioksidan dari tumbuh-tumbuhan dengan kandungan fenol, alkaloid, flavonoid, tanin dan vitamin C yang cukup tinggi. Flavonoid merupakan salah satu antioksidan kuat yang mampu mencegah berbagai kerusakan akibat stress oksidatif sehingga mampu melindungi sel dari radikal bebas (Wirjowidagdo, S.2008). Sementara itu penelitian lain menentukan bahwa ekstrak kulit buah delima mengandung senyawa tanin. Senyawa-senyawa tersebut diketahui memiliki khasiat sebagai antioksidan. (Shukla, M et al, 2008).

Metode ekstraksi terus dikembangkan untuk mempersingkat waktu ekstraksi, mendapatkan ekstrak yang lebih banyak, dan volume pelarut yang lebih sedikit, serta memiliki aktivitas yang lebih baik. Metode ekstraksi berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan dan dapat mempengaruhi kadar senyawa yang bertindak sebagai antioksidan seperti flavonoid.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan penetapan profil kandungan senyawa pada ekstrak berupa penetapan profil KLT, penetapan kadar favonoid total, dan aktivitas antioksidan dari ekstrak kulit buah delima dengan metode perendaman radikal bebas DPPH, serta melakukan analisis hubungan antara kadar senyawa flavonoid total pada ekstrak dengan aktivitas antioksidannya.

B. Landasan Teori

Delima (*Punica granatum* L) adalah tanaman buah yang berasal dari Timur Tengah dipercaya sebagai tanaman obat alami sejak 1550 SM. Di Eropa buah delima sudah umum dijual di supermarket dan mempunyai harga jual yang tinggi, sedangkan di Indonesia delima belum dimanfaatkan oleh masyarakat secara maksimal. Delima adalah spesies dari famili Punicaceae (Wirjowidagdo, S.2008).

Produk utama dari buah delima merah adalah buahnya yang biasanya dikonsumsi dalam bentuk segar maupun berbagai produk olahannya. Tetapi selain buah, kulit buah delima merah juga bisa dimanfaatkan salah satunya sebagai antioskidan. Ekstrak kulit buah delima dilaporkan memiliki kandungan senyawa flavonoid, alkaloid, fenol, tanin.

Antioksidan adalah bahan yang bekerja dengan cara menghambat atau mencegah keruntuhan, kerusakan atau kehancuran sel akibat hasil dari proses oksidasi yang berasal dari radikal bebas. Antioksidan bekerja dengan mendonorkan salah satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga senyawa oksidan tersebut dapat dihambat aktivitasnya. Kerusakan utama didalam tubuh akibat dari kerusakan oksidatif dengan penyebab utamanya adalah senyawa oksidan, baik yang terbentuk radikal bebas ataupun senyawa oksidan reaktif yang berperan sebagai oksidator. Kerusakan oksidatif disebabkan karena kurangnya antioksidan didalam tubuh sehingga tidak dapat melawan atau mengimbangi aktivitas senyawa oksidan. (Winarsi, 2007:77-79).

Dalam penelitian ini kulit buah delima merah di ekstraksi dengan menggunakan perbedaan metode ekstraksi yaitu metode maserasi dan metode refluks. Maserasi adalah proses penyarian simplisia menggunakan pelarut pada suhu kamar dengan pengocokan atau pengadukan beberapa kali, pelarut akan menembus dinding sel dan berpenetrasi ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif dan zat aktif dapat larut dan tertarik dalam pembawa. Proses ekstraksi berakhir pada saat tercapai keseimbangan konsentrasi zat aktif di dalam pelarut dan di dalam simplisia. Refluks ekstraksi dengan pelarut pada suhu titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dnegan adanya pendinginan balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai tiga kali sampai lima kali sehingga sampai dapat termasuk proses ekstraksi sempurna (Depkes RI,2000).

Penetapan kadar flavonoid total dapat ditentukan dengan menggunakan dua metode. Metode pertama merupakan metode kolorimetri menggunakan aluminium klorida dan berdasarkan pada pembentukan kompleks antara aluminium klorida dengan gugus keton C-4 dan gugus hidroksil C-3 atau C-5 kelompok flavon dan flavonol yang menghasilkan warna kuning. Selain itu, membentuk kompleks asam labil dengan gugus ortho-dihidroksil dalam cincin A atau B flavonoid. Kuersentin dilaporkan konsentrasi digunakan untuk membuat kurva kalibrasi (Ibrahim, 2011). Metode kedua merupakan metode kolorimetri dengan DNP (2,4-dinitrophenylhydrazine). Prinsip metode ini adalah reagen 2,4-dinitrophenylhydrazine yang bereaksi dengan karbonil, keton, dan aldehyd untuk 2,4-dinitrophenylhydrazine sehingga menghasilkan warna merah (Ibrahim, 2011).

C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Bahan segar yang diperoleh dari Manoko, Lembang, Jawa Barat dideterminasi di Herbarium Jatinangor Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Departemen Biologi F-MIPA Universitas Padjajaran. Hasil dari determinasi menyatakan bahwa bahan segar yang digunakan yaitu *Punica granatum* L. Dengan nama umum buah delima (Indonesia).

Pemeriksaan makroskopik kulit buah delima menunjukkan letak daun tunggal serta letak berkelompok. Bentuk daun yang lonjong, pangkalnya menyirip, ujung tumpul, bagian tepi daun rata dan permukaan atas daun mengkilap. Panjang daun 2 – 7 cm dan lebar 0,5 – 1,25 cm. Sedangkan pada buah tanaman ini berbentuk bulat atau buni, dengan diameter mencapai 6 – 10 cm. Hasil pemeriksaan makroskopik untuk kulit buah delima ini sesuai dengan pustaka yang didapatkan daun tunggal, panjang daun 1 - 9 cm dan lebar 0,5 – 2,5 cm sedangkan pada buah kulit delima ini berbentuk bulat atau buni dengan diameter 5- 12 cm. (Bracker and Bakhuizen, 1963:235).

Hasil mikroskopik buah kulit delima terdapat fragmen yang terlihat dari bahan segar dan simplisia kulit buah delima berupa jaringan gabus dan sel batu. Untuk mengamati jaringan gabus digunakan bantuan pelarut kloral hidrat sedangkan untuk sel batu digunakan bantuan pelarut fluroglusinol dan HCl

Penapisan fitokimia pada sampel simplisia dan ekstrak dari kulit buah delima merah bertujuan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa kimia yang terdapat di dalam simplisia kulit buah delima. Data yang diperoleh menunjukkan bahwa sampel yang digunakan baik simplisia maupun hasil ekstrak dengan menggunakan dua metode yaitu ekstraksi maserasi (EM) dan ekstraksi refluks (ER) secara umum memiliki keseragaman kandungan senyawa kimia dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 1. Hasil Menggunakan Metode Ekstraksi Maserasi (EM) dan Ekstraksi Refluks (ER) dan Simplisia

Golongan Senyawa	Simplisia	Maserasi	Refluks
Flavonoid	+	+	+
Saponin	-	+	-
Tanin	+	+	+
Monoterpen & Seskuiterpen	+	+	+
Kuinon	+	+	+
Steroid & Triterpen	-	-	-
Polifenolat	+	+	+
Alkaloid	+	+	+

keterangan : (+) Terdeteksi ; (-) Tidak Terdeteksi

Pengujian parameter standar dilakukan terhadap simplisia dan ekstrak kulit buah delima, terdiri dari parameter standar spesifik dan parameter standar non spesifik. Parameter standar spesifik meliputi susut pengeringan, kadar air, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam dan bobot jenis. Sedangkan pada parameter standar non spesifik meliputi kadar sari larut air, kadar sari larut etanol dan organoleptis dapat dilihat pada tabel berikut

Tabel 2. Hasil Pengujian

Parameter	simplisia	EM	ER
Susut Pengeringan	12,77%		
Kadar Air	10,25%		
Kadar Abu Total	5,70%		
Kadar Abu Tidak Larut Asam	0,60%		
Bobot Jenis		1,0041 g/mL	0,9988 g/mL
Kadar Sari Larut Air	39,25%		
Kadar Sari Larut Etanol	5,70%		

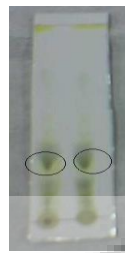
Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi dan refluks. Dalam hal ini untuk mengetahui adanya aktivitas antioksidan simplisia kulit buah delima yang terdeteksi dengan kedua metode ekstraksi yang berbeda. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi ini adalah etanol 96% : HCl dengan perbandingan 9:1, etanol 96% merupakan pelarut yang universal pelarut ini dapat melarutkan hampir semua senyawa organik yang ada pada sampel, baik senyawa polar maupun senyawa non pola, sedangkan HCl merupakan pelarut berupa asam kuat untuk memberikan suasana asam pada saat proses ekstraksi. Filtrat yang diperoleh diuapkan menggunakan *rotary vacum evaporator*. Setelah diuapkan ekstrak kental dari masing-masing ekstraksi diperoleh rendemen. Adapun tujuan dari penentuan rendemen berfungsi untuk mengetahui kadar metabolit sekunder yang terbawa oleh pelarut tersebut namun tidak dapat menentukan jenis senyawannya. Berikut ini hasil perolehan rendemen ekstrak kulit buah delima.

Tabel 3. Hasil Perolehan Rendemen Ekstrak Kulit Buah Delima

Ekstrak	Rendemen (%)
Maserasi	17,10%
Refluks	18,83%

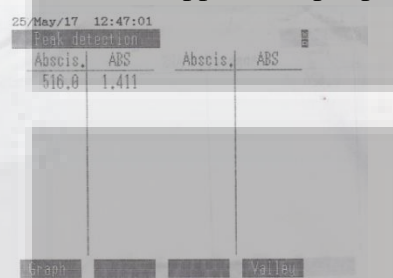
Pemantauan KLT dilakukan terhadap ekstrak kulit buah delima pada metode ekstraksi maserasi (EM) dan ekstraksi refluks (ER), pemantuan kandungan flavonoid dengan cara kromatografi lapis tipis digunakan kuersentin sebagai pembanding yang ditotolkan pada plat KLT. Eluen yang digunakan adalah etil asetat : kloroform (8:2) dengan menggunakan penampak bercak $AlCl_3$. Nilai R_f dari pengujian kuersentin adalah sebesar 0,56 untuk EM 0,43 dan ER 0,36 yang ditandai dengan adanya warna kuning kehijauan pada sinar tampak. Pemantauan senyawa flavonoid dilakukan secara kromatografi lapis tipis (KLT), fase diam yang digunakan berupa plat silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak etil asetat : kloroform dalam berbagai perbandingan untuk mengetahui perbandingan mana yang dapat memisahkan senyawa flavonoid dengan baik. Dari

semua fase gerak yang dapat digunakan eluen yang sesuai, hasil yang dapat memisahkan senyawa flavonoid dengan baik adalah etil asetat:kloroform (8:2).



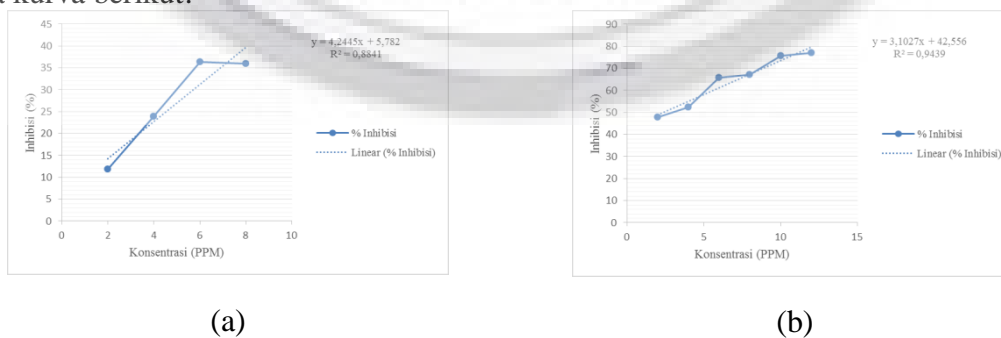
Gambar 1. Kromatogram KLT ER, FD silika gel GF₂₅₄, FG etil asetat-kloroform (8:2), penampak bercak : AlCl₃. **Gambar 2.** Kromatogram KLT EM, FD silika gel GF₂₅₄, FG etil asetat-kloroform (8:2), penampak bercak : AlCl₃.

Uji aktivitas antioksidan ekstrak kulit buah delima dilakukan dengan menggunakan metode penangkapan radikal bebas DPPH (2,2-difenilpicrilhidrazil). Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan terhadap ekstrak dari masing-masing ekstraksi maserasi dan refluks yang diperoleh. Hasil penentuan panjang gelombang maksimum DPPH dengan konsentrasi 50 ppm terdapat pada 516 nm.



Gambar 3. Hasil absorbansi DPPH

Nilai IC₅₀ adalah konsentrasi yang mampu menghambat 50% aktivitas radikal bebas. Semakin tinggi konsentrasi sampel maka nilai IC₅₀ akan semakin kecil karena radikal bebas direndam oleh antioksidan yang ada pada sampel. Pengujian aktivitas antioksidan sampel kulit buah delima dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi (EM) dan ekstraksi refluks (ER) dengan menggunakan metode DPPH, dibuat konsentrasi sampel sebesar 2,4,6,8,10, dan 12 µg/mL. Dari hasil pengukuran diperoleh nilai IC₅₀ pada EM sebesar 2,39 µg/mL, sedangkan pada ER sebesar 10,41 µg/mL, yang dapat dilihat pada kurva berikut.



Gambar 4. (a) Kurva Nilai IC₅₀ Metode Ekstraksi Refluks (b) Kurva Nilai IC₅₀ Metode Ekstraksi Maserasi

Sedangkan nilai IC_{50} yang diperoleh dari vitamin C yaitu 5,83 $\mu\text{g/mL}$. Vitamin C digunakan sebagai pembanding antioksidan, karena vitamin C termasuk antioksidan kuat. Dari hasil yang diperoleh dapat terlihat bahwa ekstrak EM menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih baik dibandingkan ekstrak hasil ER yang ditunjukkan oleh nilai IC_{50} EM yang lebih rendah dibandingkan dengan nilai IC_{50} ER.

Tabel 4. Hasil Pengujian

Sampel	% Kadar Flavonoid	Rata - Rata % Flavonoid Total
Maserasi	1,005	1,025
	1,026	
	1,045	
Refluks	1,216	1,223
	1,223	
	1,218	

Penetapan kadar flavonoid total pada konsentrasi 1000 ppm dengan senyawa pembanding kuersetin. Pada pengukuran kadar flavonoid total dilakukan dengan penambahan $AlCl_3$ dengan panjang gelombang 434 nm yang dapat membentuk kompleks, sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang ke sinar tampak yang ditandai dengan larutan menghasilkan warna yang lebih kuning. Tahapan pertama yaitu pembuatan larutan standar kuersetin dengan cara melarutkan kuersetin dengan metanol. Hasil yang didapat bahwa kadar flavonoid total pada ekstraksi refluks memiliki kadar yang lebih besar dibandingkan dengan metode ekstraksi maserasi. Hal ini dikarenakan senyawa flavonoid yang terdapat dalam kulit buah delima memiliki karakteristik senyawa thermostabil, senyawa tertarik lebih sempurna dengan menggunakan metode ekstraksi cara panas ini.

D. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa potensi aktivitas antioksidan pada ekstrak hasil EM lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak hasil ER hal ini ditunjukkan oleh nilai IC_{50} EM yang lebih rendah yaitu 2,39 ppm dibandingkan dengan nilai IC_{50} ER yaitu 10,41 ppm. Nilai kadar flavonoid total pada EM sebesar 1,025 % lebih rendah pada ER sebesar 1,223 %. Dengan demikian, diduga aktivitas antioksidan pada kulit buah delima merah tidak ditentukan oleh kadar flavonoidnya.

E. Saran

Untuk penelitian selanjutnya, disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap sampel kulit buah delima dalam keadaan kering dan mengidentifikasi senyawa yang berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan. Perlu dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode lain untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada kulit buah delima.

Daftar Pustaka

- Backer, C.A., Bakhuizen van den Brink, (1963). *Flora of Java (Spermatophytes Only)*, vol. 1, Wolter-Noordhoff, NVP., Groningen.
- Dapartemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat 3-5*. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.
- Ibrahim. (2011). *Analisis Total Fenol, Total Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Sayuran Pakchoy (Brassica chinensis L.) dengan Perawatan Ekstrak Bawang Putih*

Terfermentasi. Skripsi, Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Riau.

Shukla, M, Gupta, K, Rasheed, Z, Khan, K, Haqqi, T. Bioavailable Constituents Metabolites of Pomegranate (*Punica granatum L*) Preferentially Inhibit COX2 activity *ex vivo* and IL-1beta-induced PGE2 Production In Human Chondrocytes In Vitro. *Journal of Inflammation* (2008:19).

Winasari, H. (2007). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Potensi dan Aplikasi Dalam Kesehatan*. Kanisius, Yogyakarta.

Wiryouwidagdo, S.(2008). *Delima (Punica granatum) Obat Tradisional Indonesia yang merupakan sumber antioksidan, Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia*.

Youngson, Robert. 2005. (Antioksidan) : *Manfaat Vitamin C dan E Bagi Kesehatan*. Susi Purwoko Penerjemah; Editor Edisi bahasa Indonesia. Jakarta.

